

Da disfunção endotelial à oclusão vascular papel do sistema renina – angiotensina [53]

PEDRO MARQUES SILVA

Consultor de Medicina Interna
Especialista de Farmacologia Clínica e Hipertensão
Responsável do Núcleo de Investigação Arterial e
da Consulta de Hipertensão e Dislipidemias da Unidade Funcional Medicina IV
– Hospital de Santa Marta, Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, Lisboa, Portugal

Rev Port Cardiol 2010; 29 (05): 801-824

RESUMO

Há um conjunto de dados que fundamentam o papel central do sistema renina-angiotensina (SRA) na doença aterosclerótica e no contínuo da doença cardiovascular: da disfunção endotelial à oclusão vascular.

Nos estádios mais precoces da doença vascular, o SRA promove o aparecimento de alterações funcionais, de que a disfunção endotelial é o melhor paradigma. A deposição de lipoproteínas aterogénicas na íntima, a sua modificação oxidativa e o desencadear e a amplificação da resposta inflamatória reforça o papel aterogénico que o SRA pode favorecer.

As células inflamatórias são uma das principais fontes de enzima de conversão e de angiotensina II na parede vascular, num processo que define a modificação estrutural da artéria e a progressão da doença aterosclerótica. A angiotensina II promove a migração do músculo liso vascular e a sua diferenciação fenotípica de síntese que acelera a doença vascular. Ao modular a resposta inflamatória e, de uma forma global, todos os elementos da placa, a angiotensina II tem uma palavra na instabilidade da mesma, na emergência dos eventos agudos e no favorecimento do

From endothelial dysfunction to vascular occlusion: Role of the renin-angiotensin system

ABSTRACT

There is a body of evidence that supports the important role of the renin-angiotensin system (RAS) in atherosclerotic disease and in the cardiovascular disease continuum: from endothelial dysfunction to vascular occlusion.

In the earlier stages of vascular disease, the RAS promotes functional changes, of which endothelial dysfunction is the best example. The deposition of atherogenic lipoproteins in the intima, their oxidative modification and the onset and amplification of the inflammatory response strengthens the atherogenic role of the RAS.

Inflammatory cells are one of the main sources of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin II (Ang II) in the vascular wall, in a process that leads to structural changes in the artery and progression of atherosclerotic disease. Ang II promotes the migration of vascular smooth muscle cells and their phenotypic differentiation in synthesis that accelerates vascular

estado pró-trombótico local que determina o enfarte.

Palavras-chave:

Sistema renina-angiotensina; Aterosclerose; Inflamação; Disfunção Endotelial; *Stress* oxidante

disease. By modulating the inflammatory response and, in general, all the elements of the plaque, Ang II plays a part in its instability, in the onset of acute events and in the promotion of the local prothrombotic state that leads to infarction.

Key words

Renin-angiotensin system; Atherosclerosis; Inflammation; Endothelial dysfunction; Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é uma cascata enzimática que tem como produto, porventura mais importante, a angiotensina II, péptido que, actuando no coração, rim, músculo liso vascular, supra-renal e cérebro, desempenha um papel fundamental no controlo da pressão arterial, na manutenção da homeostasia do sódio e água e no equilíbrio, funcional e estrutural, cardiovascular.

A angiotensina II provoca a constrição directa do músculo liso arteriolar e contribui, directa ou indirectamente, para a disfunção endotelial. Modula também o tono adrenérgico, estimula a transmissão sináptica, promove a libertação de catecolaminas, pela medula da supra-renal, e participa nos processos cognitivos e na aprendizagem de comportamentos (além de despertar a sede e de aumentar a secreção de vasopressina). No rim, a angiotensina II regula o fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração e a hemodinâmica glomerular (assim como a permeabilidade às proteínas), o transporte tubular de sódio (e reabsorção de água), a acidificação e a concentração da urina. Inibe a libertação da renina, estimula a síntese e secreção de aldosterona e influencia um enunciado número de factores locais vaso-activos e de crescimento, que modulam diversas respostas inflamatórias e proliferativas.

Por tudo isto, importa elucidar a contribuição decisiva do SRA na *remodelagem* vas-

INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) is an enzymatic cascade, the most important product of which is angiotensin II (Ang II), a peptide that acts on the heart, kidney, vascular smooth muscle, adrenals and brain, playing an important role in blood pressure control, sodium and water homeostasis, and cardiovascular functional and structural balance.

Ang II directly causes arteriolar smooth muscle contraction and contributes directly and indirectly to endothelial dysfunction. It also modulates adrenergic tone, stimulates synaptic transmission, promotes catecholamine release by the adrenal medulla, and is involved in cognitive processes including learning of behaviors, as well as provoking thirst and increasing vasopressin secretion. In the kidney, Ang II regulates renal blood flow, filtration rate and glomerular hemodynamics (as well as permeability to proteins), tubular sodium transport and water reabsorption, and urine acidification and concentration. It also inhibits the release of renin, stimulates the synthesis and secretion of aldosterone, and influences a large number of local vasoactive and growth factors that modulate various inflammatory and proliferative responses.

For these reasons, it is important to determine the role of the RAS in vascular remodeling, the pathophysiology of vascular disease and the modulation of cardiovascular risk.

cular, na fisiopatologia da doença vascular e na modulação e potenciação do risco cardiovascular.

2. Genótipos do SRA e risco cardiovascular

Vários polimorfismos dos genes do SRA têm sido intensamente estudados e potencialmente relacionados com variações da pressão arterial e com a ocorrência e a progressão de várias patologias cardiovasculares (disfunção endotelial, aterosclerose, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca)⁽¹⁾.

O polimorfismo do gene *ECA* (enzima conversora da angiotensina) consiste na ausência (deleção – D) ou na presença (inserção – I) de um fragmento de 287 pares de bases de DNA no intrão 16, dando origem a três genótipos diferentes: DD, DI e II⁽²⁾. O alelo D está relacionado com níveis da actividade da *ECA* mais elevados e com eventuais efeitos secundários dependentes da angiotensina II^(3, 4).

Alguns trabalhos^(5, 6) sugerem uma aparente relação entre os diversos polimorfismos da *ECA* e a disfunção endotelial, capaz de modular, de forma significativa, a resposta vasodilatadora, micro e macrovascular, dependente da inibição do SRA (os doentes portadores do alelo D parecem ter um tono vascular dependente do músculo liso vascular aumentado, contrariado, parcialmente, pela maior actividade basal da sintetase do monóxido de azoto nos indivíduos com aterosclerose clínica).

Os polimorfismos genéticos da *ECA* parecem também modular o balanço hemostático e fibrinolítico, por processos diversos da disfunção endotelial⁽⁵⁾ (o genótipo DD está significativamente associado a níveis circulantes mais elevados de PAI-1, fibrinogénio, factor de von Willebrand e t-PA), e terem um papel evidente na evolução da síndrome hipertensiva, ao influírem no risco de ocorrência de hipertrofia ventricular esquerda (apesar de alguns dados menos consistentes, o genótipo DD tem sido associado com aumentos do índice de massa ventricular esquerda e com

2. RAS genotypes and cardiovascular risk

Several polymorphisms of RAS genes have been thoroughly studied and relationships have been suggested with blood pressure variations and with the occurrence and progression of various cardiovascular pathologies, including endothelial dysfunction, atherosclerosis, left ventricular hypertrophy and heart failure⁽¹⁾.

The polymorphism of the ACE (angiotensin-converting enzyme) gene consists of the deletion (D) or insertion (I) of a 287-bp DNA fragment in intron 16, giving rise to three genotypes: DD, DI and II⁽²⁾. The D allele is associated with higher levels of ACE activity and with Ang II-dependent secondary effects^(3, 4).

Some studies^(5, 6) have suggested a link between the different ACE genotypes and endothelial dysfunction, with significant alterations in micro- and macrovascular vasodilatory responses that depend on RAS inhibition: vascular tone in D allele carriers appears to be affected by increased vascular smooth muscle, which is partly countered by greater basal activity of nitric oxide (NO•) synthase in individuals with clinical atherosclerosis.

The ACE polymorphism also appears to modulate hemostatic and fibrinolytic balance, through various aspects of endothelial function⁽⁵⁾ – the DD genotype is significantly associated with higher circulating levels of plasminogen activator inhibitor (PAI-1), fibrinogen, von Willebrand factor and tissue plasminogen activator (t-PA) – and clearly has a role in the evolution of the hypertensive syndrome by increasing the risk for left ventricular hypertrophy (although the data are inconsistent, the DD genotype has been linked to increased left ventricular mass index and a higher prevalence of eccentric left ventricular hypertrophy).

The significance of ACE genotypes as a risk factor for cardiovascular events is less clear; it appears to be largely dependent on the homogeneity of the study population and the methodology used⁽³⁾. A recent case-control study of a Portuguese population of 517 con-

maior prevalência de hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo).

O papel dos genótipos da ECA como factor de risco para a ocorrência de eventos cardiovasculares é mais discutível e parece estar largamente dependente da homogeneidade da população estudada e das metodologias adoptadas⁽³⁾. Recentemente, num estudo de caso-controlo na população portuguesa (517 controlos e 301 doentes coronários), verificou-se uma associação positiva do genótipo DD com o risco de enfarte do miocárdio (*odds ratio* = 1.79; IC 95%: 1.31 – 2.45, $P < 0.001$)⁽⁷⁾ e com a extensão e gravidade da doença coronária ($P < 0.0001$), confirmada por coronariografia⁽⁸⁾. Apesar disso, e tal como já sugerimos, o facto do risco cardiovascular derivado do polimorfismo I/D da ECA depender da população estudada diminui muito o seu possível papel como indicador prognóstico na definição da estratégia mais adequada^(1, 3).

A par do polimorfismo da ECA, os outros polimorfismos de outros elementos do SRA têm também apresentado resultados discordantes^(1, 4, 6). São os casos do alelo T do polimorfismo M235T do angiotensinogénio (que condiciona níveis plasmáticos mais elevados de angiotensinogénio e um possível sinergismo com a apolipoproteína E4), das transversões 1166A/C (também com uma possível interacção gene-gene com o genótipo DD) e 810T/A do receptor AT1 e do polimorfismo C825T da proteína G da subunidade, 3 deste receptor.

2. Sistemas renina-angiotensina-aldosterona locais e celulares

A compreensão do pleomorfismo funcional do SRA passou, obrigatoriamente, pela confirmação da existência, no todo ou em parte, de elementos do SRA nos vasos (facto particularmente importante), no cérebro, no rim e em muitos outros tecidos não cardiovasculares⁽⁹⁻¹¹⁾.

Assim, por exemplo, nos miócitos dos vasos (e nas células mesangiais) foi descrito um *receptor (pró)-renina*, cuja activação determina o aumento da produção local de angiotensina II, a geração de um 2º mensageiro – com trans-

trolos and 301 coronary patients showed a positive association between the DD genotype and risk for myocardial infarction (odds ratio = 1.79; 95% CI: 1.31-2.45, $p < 0.001$)⁽⁷⁾ and with extent and severity of coronary disease ($p < 0.0001$) documented by coronary angiography⁽⁸⁾. However, as suggested above, the fact that the cardiovascular risk deriving from the I/D ACE polymorphism depends on the population studied considerably weakens its usefulness as a prognostic indicator in defining therapeutic strategies^(1, 3).

As with the ACE polymorphism, research into polymorphisms of other elements of the RAS has also produced conflicting results^(1, 4, 6), including the T allele of the M235T polymorphism of angiotensinogen (which leads to higher plasma angiotensinogen levels and may have a synergistic effect with apolipoprotein E4), the A1166C (which may have a gene-gene interaction with the DD phenotype) and T810A transversions of the AT₁ receptor, and the C825T polymorphism of the G-protein, 3 subunit of this receptor.

2. Local and cellular renin-angiotensin systems

An understanding of the multiple actions of the RAS only came after the discovery of elements of the system in blood vessels (a particularly important finding), the brain, kidneys, and many other non-cardiovascular tissues⁽⁹⁻¹¹⁾.

For example, a (pro)-renin receptor has been described in myocytes in blood vessels, as well as in mesangial cells, which when activated increases local production of Ang II and generates a second messenger and intracellular signal transduction, leading to biological effects. At the same time, cardiomyocytes and other cells can internalize plasma renin and synthesize Ang II in their cytoplasm, as well as other forms of the enzyme such as the intracellular exon 1A renin, which is overexpressed, for example, following myocardial infarction⁽¹⁰⁾. Experimental studies suggest that the (pro)-renin receptor may be linked to various aspects of high blood pressure, cardiac

dução intracelular do sinal – e a provocação de efeitos biológicos. Por outro lado, os cardiomiócitos (e outras células) são capazes de interiorizar a renina plasmática (e de gerar angiotensina II no seu citoplasma) ou de sintetizarem formas alternativas desta enzima: o *exão 1-A da renina*, intracelular, sobreexpresso, por exemplo, no ventrículo esquerdo, no pós-ênfarte do miocárdio⁽¹⁰⁾. Trabalhos experimentais sugerem que o receptor (pró-)renina pode estar relacionado com diversos aspectos da síndrome hipertensiva, com a fibrose e *remodelagem* cardíaca e com a fisiopatologia da nefropatia diabética⁽¹²⁾.

Centrados na renina, cuja participação para os SRA teciduais tem sido motivo de maior controvérsia, não podemos esquecer que todos os restantes elementos do sistema (angiotensinogénio, ECA, receptores da angiotensina II e aldosterona) têm sido reiteradamente detectados nos mais diversos tecidos⁽¹¹⁾. Em muitos modelos animais, as concentrações locais de angiotensina II, dependentes do angiotensinogénio e da ECA local, cursam em paralelo com os níveis plasmáticos, sugerindo que a renina, de origem renal, é o seu principal determinante. No entanto, noutros casos, os níveis locais de angiotensina II são largamente divergentes das concentrações plasmáticas, confirmando o papel de factores locais (e de outros elementos) na sua síntese e na sua actuação parácrina e autócrina.

Contudo, o SRA ganhou nova complexidade, quando se reconheceu, nos cardiomiócitos, a interiorização e o transporte nuclear ou mitocondrial da angiotensina II e se identificaram “*receptores AT1-like*”, no núcleo e na cromatina, com elevada afinidade para o péptido⁽¹⁰⁾. A ligação da angiotensina II a estes receptores determina um aumento da transcrição, uma maior sensibilidade da cromatina para a digestão por nucleases e efeitos biológicos diversos (aumento do fluxo intracelular de cálcio e acréscimo na expressão de PDGF e angiotensinogénio, por exemplo). Ora, esta conceptualização sugere que a angiotensina II possa, também, ter efeitos intracrinicos potenciais (modulando acções na célula onde é sintetizada).

fibrosis and remodeling, and the pathophysiology of diabetic nephropathy⁽¹²⁾.

Despite the focus on renin, whose role in the tissue RAS has been the subject of much debate, it should not be forgotten that all the other elements of the system (angiotensinogen, ACE, Ang II receptors and aldosterone) have been repeatedly detected in various tissues⁽¹¹⁾. In many animal models, local Ang II levels, which are dependent on angiotensinogen and local ACE, mirror plasma levels, suggesting that renin, originating in the kidneys, is the main determining factor. However, in other cases, local Ang II levels differ considerably from plasma concentrations, which confirms the importance of local factors, as well as other elements, in its paracrine and autocrine synthesis and action.

However, even greater complexity was revealed in the RAS with the discovery of internalization and nuclear or mitochondrial transport of Ang II in cardiomyocytes and of AT₁-like receptors in the nucleus and in chromatin with a high affinity for the peptide⁽¹⁰⁾. Binding of Ang II to these receptors leads to increased transcription, greater susceptibility of chromatin to digestion by nucleases, and a range of biological effects, including increased intracellular calcium flow and enhanced expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and angiotensinogen. This suggests that Ang II also has intracrine effects, acting within the cell in which it is synthesized.

3. Angiotensin II receptors and signal transduction

Despite these discoveries, it is accepted from both a theoretical and functional viewpoint that virtually all effects, both systemic and local, of Ang II result from its interaction with specific G-protein coupled membrane receptors (associated with guanine nucleotides).

Two main Ang II receptors are currently recognized: AT₁ (AT₁-R) and AT₂ (AT₂-R), widely distributed in different organs and tissues, which are distinguished by their different susceptibility to reducing agents, their

3. Receptores da angiotensina II e transdução do sinal

Apesar do enunciado, reconheçamos – de um ponto de vista didático e funcional – que a quase totalidade dos efeitos, sistêmicos e locais, da angiotensina II resultam da sua interação com receptores específicos de membrana, acoplados a proteínas G (proteínas associadas a nucleótidos de guanina).

No essencial, são hoje reconhecidos dois receptores principais da angiotensina II, os receptores AT₁ (AT₁-R) e os receptores AT₂ (AT₂-R), larga e diversamente distribuídos nos diferentes órgãos e tecidos, que se distinguem entre si pela diferente susceptibilidade a agentes redutores, pela afinidade e tipo de resposta determinada pelos ligandos endógenos (nomeadamente a angiotensina II) e pela selectividade de ligação aos ligandos exógenos⁽¹³⁻¹⁵⁾. Os dois receptores têm uma estrutura polipeptídica similar, com cerca de 360 aminoácidos (e 7 domínios transmembrana), mas com uma distinta homologia de sequências ($\approx 30\%$). O AT₁-R é codificado por um gene com 60 Kb e 5 exões localizado no cromossoma 3 e o AT₂-R por um gene com 3 exões do cromossoma X.

Após a ligação do ligando endógeno ao AT₁-R, desencadeia-se um complexo processo intracelular de cascatas de transdução de sinal (*Figura 1*) que culminam na mediação de uma resposta hipertrófica, migratória e proliferativa⁽¹⁵⁻¹⁹⁾ e cuja compreensão explicita muitos dos efeitos da angiotensina II (e de outros péptidos do SRA) na doença cardiovascular.

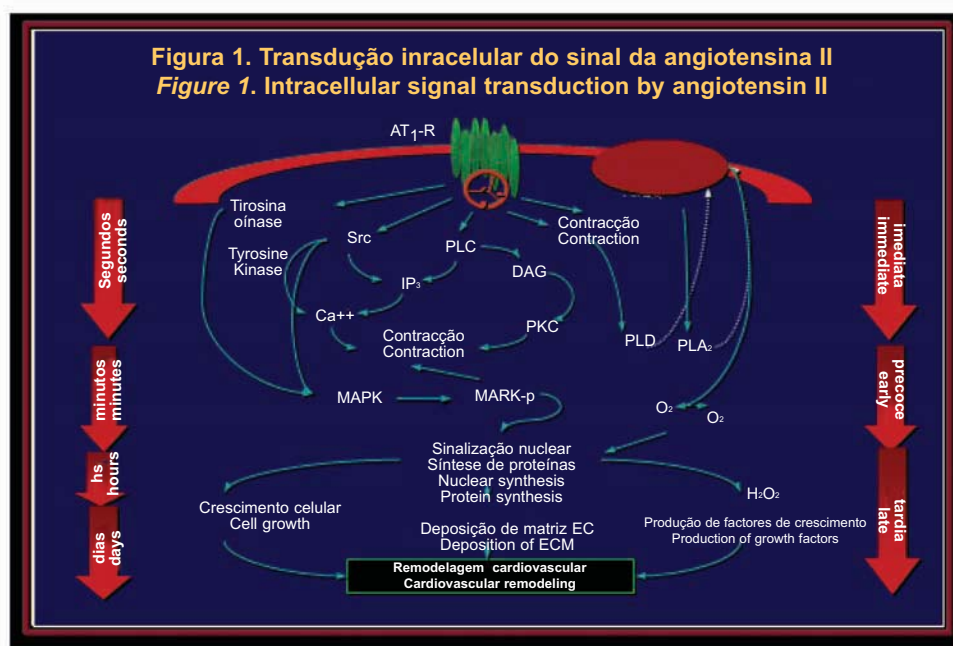
A activação da proteína G, acoplada ao AT₁-R, induz uma rápida fosforilação da proteína tirosina da família da *src* *cínase* e dos diversos substratos da *src*: *cínase* de adesão focal (FAK), *tirosina cínase* 2, *paxilina*, *tensina*, *Janus cínase* 2 (JAK2) e *factor de transdução de sinal e activador da transcrição* (STAT1)¹. Como consequência, há a activação de um conjunto de proteínas de regulação (*Shc*, *Grb2* e *Sos*), de pequenas proteínas G (*Ras* e *Rho*) e de MAP *cínases*ⁱ e a expressão de diversos protooncogenes (*c-fos*, *c-jun* e *c-myc*), com a activação de factores de trans-

affinity and response to endogenous ligands (particularly Ang II), and the selectivity of their binding to exogenous ligands⁽¹³⁻¹⁵⁾. The two receptors have a similar polypeptide structure, with about 360 amino acids and seven transmembrane domains, but have a different sequence homology ($\approx 30\%$). The AT₁-R is coded by a 60-kbp gene with 5 exons on chromosome 3, while the AT₂-R is coded by a 3-exon gene on the X chromosome.

After the endogenous ligand has bound to the AT₁-R, a complex series of intracellular signal transduction cascades is triggered (*Figure 1*) that culminates in a hypertrophic, migratory and proliferative response⁽¹⁵⁻¹⁹⁾ that explains many of the effects of Ang II, as well as of other RAS peptides, in cardiovascular disease.

Activation of the G protein coupled to the AT₁-R induces rapid phosphorylation of the tyrosine of the Src kinase family and of various substrates of Src: focal adhesion kinase (FAK), tyrosine kinase 2, paxillin, tensin, Janus kinase 2 (JAK2), and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1). This results in the activation of a series of regulatory proteins (Shc, Grb2 and Sos), small G proteins (Ras and Rho), and mitogen-activated protein kinases (MAPK): extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), p38 and c-jun N-terminal kinases (JNK), and the expression of a range of proto-oncogenes (*c-fos*, *c-jun* and *c-myc*), activating the nuclear transcription factors activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), which modulate the expression of various genes that regulate protein synthesis and proliferation, extracellular matrix deposition and the inflammatory response.

Within minutes of AT₁-R activation, various receptors for proproliferative (heparin-binding epidermal growth factor [HB-EGF], insulin-like growth factor-1 [IGF-1], platelet-derived growth factor- β [PDGF- β], basic fibroblast growth factor [FGF] and vascular endothelial growth factor [VEGF]) and antipro-



crição nuclear (*AP-1* e *NF-κB*)ⁱ, que determinam a modulação da expressão de vários genes mediadores da síntese/proliferação proteica, da deposição da matriz extracelular e da resposta inflamatória.

Com a activação do AT₁-R, ocorre a transactivação rápida (em minutos) e a modulação de diversos receptores de factores de crescimento pró-proliferativos (HB-EGF, IGF-1, PDGF-β, bFGF e VEGF)² e antiproliferativos (TGF-β)ⁱⁱ (*Quadro 1*), que cooperam intimamente com a angiotensina II e que constituem um elemento central da resposta hipertrófica/hiperplásica.

Paralelamente, há, também, a estimulação de diversas fosfolípases (PL) C, D e A₂. A activação da PLC induz a formação de diacilglicerol (DAG) e de trifosfato de inositol (IP₃), que, através da proteína cínase C (PKC), leva à activação dos canais de cálcio, presentes no sarcolema e à contracção do músculo liso vascular. Por outro lado, a activação das PLD e PLA₂ estimula a NAD(P)H oxidase de membrana e induz a produção de radicais livres de oxigénio (ROS), nomeadamente de anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), mas também o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), diversos radicais lipídicos e peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

liferative growth factors (transforming growth factor-β [TGF-β]) are transactivated and modulated (*Table 1*). These act in close concert with Ang II and are central to the hypertrophic/hyperplastic response.

At the same time the phospholipases PLC, PLD and PLA₂ are also activated. Activation of PLC induces the formation of diacylglycerol (DAG) and inositol-triphosphate (IP₃), which, via protein kinase C (PKC), activates calcium channels in the sarcolemma and leads to vascular smooth muscle contraction. Meanwhile, activation of PLD and PLA₂ stimulates NAD(P)H oxidase in the cell membrane and induces the production of reactive oxygen species (ROS), particularly the superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$), but also the hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$), various lipid radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2).

NAD(P)H oxidase is a membrane enzyme (*Figure 2*) composed of various structural subunits that transfers electrons to molecular oxygen donated by NADH or NAD(P)H; its activity is regulated by mechanical factors such as shear stress, cytokines, and hormones, including Ang II^(16, 20-24). The precise molecular structure of the vascular oxidase and its subunits is not yet known, but some of its main compo-

Quadro I. Factores regulados pela angiotensina II

- Factores de crescimento: TGF- β , PDGF- β , bFGF, HB-EGF, IGF.1, VEGF (e TGF-b)
- Citocinas: interleucina-6 (IL-6), TNF- α
- Quimiocinas: MCP-1, IL-8, RANTES
- Moléculas de adesão: VCAM-1, ICAM-1, P-selectina
- Péptídeos: endotelina-1 (ET-1)
- Lípidos: prostaglandinas, factor activador das plaquetas (PAF)
- COX-2
- NO \cdot

Table I. Factors regulated by angiotensin II

- Growth factors: TGF- β , PDGF- β , bFGF, HB-EGF, IGF.1, VEGF (and TGF-b)
- Cytokines: IL-6, TNF- α
- Chemokines: MCP-1, IL-8, RANTES
- Adhesion molecules: VCAM-1, ICAM-1, P-selectin
- Peptides: endothelin-1 (ET-1)
- Lipids: prostaglandins, platelet activating factor (PAF)
- COX-2
- NO \cdot

A *NAD(P)H oxidase* vascular é uma enzima de membrana (*Figura 2*), constituída por diversas subunidades estruturais, que é capaz de transferir electrões para o oxigénio molecular, doados pelo NADH ou NADPH, e cuja a actividade é regulada por factores mecânicos (tensão de cisalhamento), citocinas e hormonas (angiotensina II)^(16, 20-24). A identidade molecular (e as subunidades) da oxídase, presente nos vasos, não está ainda claramente esclarecida, mas reconhecem-se já alguns dos seus componentes essenciais: p47^{phox} (citoplasmático), p67^{phox}, p22^{phox} (membranoso), p91^{phox} e o seu homólogo nox-1 (de *NADPH oxidase*, diversa da dos fagócitos)^(17, 19, 24).

4. Disfunção endotelial e apoptose. Músculo liso vascular

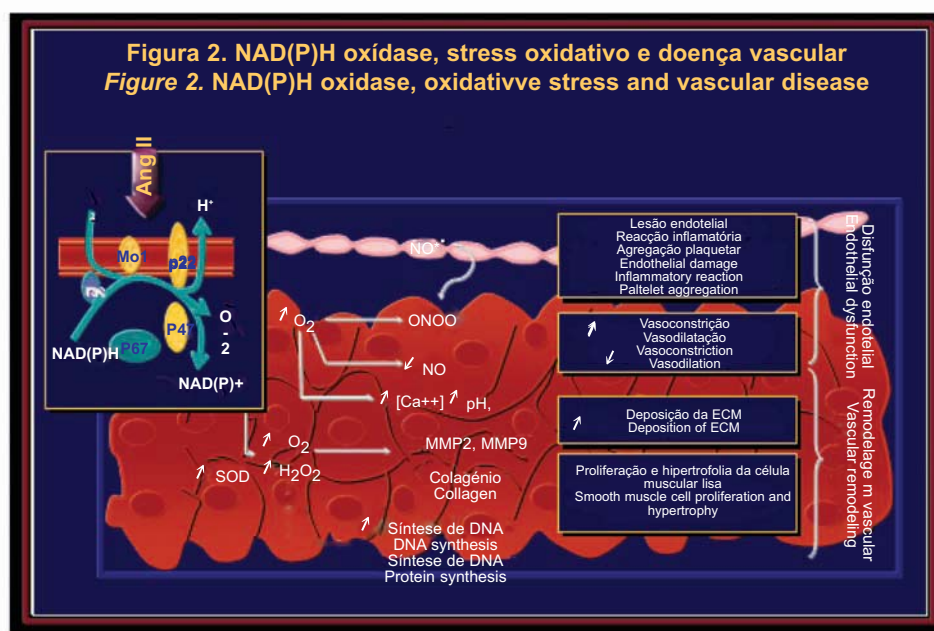
Os ROS, com origem na NAD(P)H oxídase (e noutros sistemas enzimáticos: xantina-oxídase, lipooxigenase, ciclooxigenase e outros), modulados pela angiotensina II (na célula endotelial e no músculo liso vascular), estão envolvidos na resposta hipertrófica e proliferativa (muitos dos factores de crescimento são

have been identified: p47^{phox} (cytoplasm), p67^{phox}, p22^{phox} (membrane), p91^{phox} and its homologue nox-1 (from NAD(P)H oxidase, which differs from that of phagocytes)^(17, 19, 24).

4. Endothelial dysfunction and apoptosis: vascular smooth muscle

Reactive oxygen species, originating from NAD(P)H oxidase and from other enzyme systems including xanthine oxidase, lipooxygenase and cyclooxygenase, modulated by Ang II in endothelial cells and vascular smooth muscle, are involved in the hypertrophic and proliferative response (many growth factors are influenced by redox reactions)^(9, 16, 17, 25), in the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules (interleukin [IL]-6, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1] and vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1]) via activation of NF- κ B, and in the modulation of metalloproteinase activity, altering the composition of the extracellular matrix and affecting vascular remodeling and atherosclerotic plaque stability (*Figure 2*).

For example, structural alterations to vessels arising from arterial hypertension, with



influenciados por respostas de oxidação-redução)^(9, 16, 17, 25), na expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (IL-6, MCP-1 e VCAM-1)ⁱⁱⁱ – através da ativação do NFκB – e na modulação da actividade das metaloproteínases (modificando a composição da matriz extracelular, interferindo na remodelagem vascular e na instabilidade da placa aterosclerótica) (Figura 2).

Como exemplo, as alterações estruturais vasculares dependentes da hipertensão arterial (com proliferação e migração da célula muscular lisa) estão largamente relacionadas com o aumento do stress oxidante, dependente da activação da PLD, da PKC e da NAD(P)H oxidase, assim como com a maior expressão (nos macrófagos da parede vascular) de receptores para lípidos modificados (receptor *scavenger* da classe A e receptor da classe B CD36).

A fase inicial de um processo inflamatório passa, na generalidade, por um aumento local da permeabilidade vascular e pela, consequente, transudação celular (conjuntamente com um fluído rico em proteínas). A angiotensina II é capaz de regular a permeabilidade vascular⁽²⁶⁾, por processos em parte relacionados com os seus efeitos tensionais e hemodinâmicos directos, mas também, em larga

proliferation and migration of smooth muscle cells, are closely linked to increased oxidative stress caused by the activation of PLD, PKC and NAD(P)H oxidase, as well as to upregulation in macrophages in the vascular wall of receptors for modified lipids (scavenger receptors class A and class B [CD36]).

The initial phase of the inflammatory process is generally locally increased vascular permeability, leading to cellular transudation, together with a protein-rich fluid. Ang II regulates vascular permeability⁽²⁶⁾ through processes partly related to its direct effects on blood pressure and hemodynamics, but also largely dependent on the local release of various mediators including prostaglandins (PG) (leukotriene C₄, PGE₂ and PGI₂) and VEGF (the latter, besides its central role in angiogenesis, significantly affects inflammation and vascular permeability in various physiological and pathological situations).

However, one of the most important pathophysiological aspects of oxidative stress in the vessel wall is the role of ROS in modifying endothelial function and vascular tone^(8, 21, 25-28).

In general terms, production of nitric oxide (NO•) by constitutive endothelial nitric oxide

medida, dependentes da libertação local de mediadores diversos: prostaglandinas (PG) (leucotrieno C4, PGE₂ e PGI₂) e VEGF (este último, além de ter um papel central na angiogénese, modula, de forma importante, a inflamação e a permeabilidade vascular em diversas condições fisiológicas e patológicas).

No entanto, um dos aspectos fisiopatológicos mais relevantes do *stress* oxidante na parede vascular deriva dos efeitos do ROS na modificação da função endotelial e na modulação do tono vascular^(8, 21, 25-28).

Em termos gerais, a diminuição do monóxido de azoto (NO•), produzido pela sintetase do monóxido de azoto, constitutiva, endotelial (eNOS) pode ocorrer como consequência da menor expressão da eNOS (como ocorre em fases avançadas da doença aterosclerótica), de um défice, funcional ou absoluto, de substrato (L-arginina) ou de cofactores da eNOS (particularmente da tetrahidrobiopterina), de um defeito na transdução de sinal e na activação da eNOS (reconhecida na hipertensão arterial e, possivelmente, na hipercolesterolemia) ou da degradação rápida, oxidativa, do NO• por ROS.

Assim, o anião superóxido, a NAD(P)H oxidase (actuada pela angiotensina II) e o NO• constituem a tríada subjacente à disfunção endotelial e a essência de muitas das complicações vasculares relacionadas com a hipercolesterolemia, a diabetes *mellitus*, a hipertensão arterial ou o tabagismo⁽²⁵⁾.

O anião superóxido (•O₂⁻), de origem vascular, desempenha duas funções distintas: uma, de tipo parácrino, extracelular, influenciando o tono arterial, dependente do endotélio, a outra, intracelular, de 2º mensageiro, afectando, a longo prazo, a expressão fenotípica das células vasculares⁽¹⁹⁾.

Os ROS, nomeadamente o •O₂⁻, motiva uma redução da biodisponibilidade e da actividade do NO•. A interacção, intra e extracelular, entre o NO• e o •O₂⁻ é uma reacção muito rápida (6.7x10⁹ mol/l⁻¹•s^{-1.9}) e dificilmente contrariada pelos sistemas de defesa enzimáticos antioxidantes (a reacção entre o NO• e a superóxido dismutase é três vezes menos rápi-

synthase (eNOS) can be reduced by downregulation of eNOS (as in advanced stages of atherothrombotic disease), a functional or absolute deficiency of its substrate (L-arginine) or of its cofactors (particularly tetrahydrobiopterin), defective signal transduction and eNOS activation (which is known to occur in hypertension and possibly in hypercholesterolemia), or rapid oxidative degradation of NO• by ROS.

The superoxide anion (•O₂⁻), NAD(P)H oxidase (activated by Ang II) and NO• thus constitute a triad underlying endothelial dysfunction and are at the heart of many of the vascular complications associated with hypercholesterolemia, diabetes, hypertension and smoking⁽²⁵⁾.

The superoxide anion, originating in blood vessels, has two distinct functions: a paracrine (extracellular), endothelium-dependent influence on arterial tone, and an intracellular role as a second messenger, affecting the long-term phenotypic expression of vascular cells⁽¹⁹⁾.

ROS, particularly •O₂⁻, reduce the bioavailability and activity of NO•. Intra- and extracellular reactions between NO• and •O₂⁻ are extremely rapid (6.7x10⁹ mol/l⁻¹•s^{-1.9}) and difficult to counteract through enzymatic antioxidant defenses: the reaction between NO• and the superoxide is three times faster than with superoxide dismutase. Inhibition of eNOS and inactivation of NO• enhance local synthesis of endothelin-1 (ET-1) and the autocrine effects of Ang II.

ET-1 is an important intermediary in vascular inflammation that affects autocrine oxidative stress, endothelial dysfunction and remodeling modulated by Ang II; this is one of many examples of information exchange, or crosstalk, between different signaling pathways that play a part in the process of vascular damage⁽²⁶⁾.

However, as pointed out above, vascular •O₂⁻ also has paracrine effects⁽¹⁹⁾, acting as a second messenger and influencing the phenotypic expression of cells, particularly myocytes of the vessel wall⁽²³⁾. ROS, by activating MAPK, Akt, JAK2 and STAT1, induce early transcription of genetic factors that modify the

da que a descrita com o superóxido). A inibição da eNOS e a inativação do NO• facilita a síntese local de endotelina-1 (ET-1) e os efeitos autacóides da angiotensina II.

A ET-1 é um intermediário eficaz na inflamação vascular, capaz de influenciar o *stress* oxidante autacóide, a disfunção endotelial e a *remodelagem*, movida pela angiotensina II, num dos muitos exemplos de troca de informações (*crosstalk*) entre vias de sinalização que, conjuntamente, participam no processo de lesão vascular⁽²⁶⁾.

No entanto, como já dissemos, o •O₂⁻ vascular tem também efeitos parácrinos potenciais⁽¹⁹⁾, podendo actuar como segundo mensageiro e influenciar a expressão fenotípica celular, nomeadamente dos miócitos da parede vascular⁽²³⁾. Os ROS, através da activação da MAPK, Akt, JAK e STATⁱ, induzem a transcrição precoce de factores genéticos modificadores da expressão do músculo liso, que adquire o fenótipo secretor (em vez de contráctil). Além disso, os ROS são capazes de regular a actividade de metaloproteinases degradadoras do colagénio e da matriz extracelular (pró-MMP-9 e pró-MMP-2). O aumento da expressão da ciclooxigenase inflamatória (COX-2), induzida pela angiotensina, via AT₁-R, estimula a síntese macrofágica de MMP-2 (72-kDa) e MMP-9 (92-kDa)⁽¹⁹⁾, uma e outra intimamente relacionada com a degradação da capa fibrosa e com a vulnerabilidade intrínseca da placa aterosclerótica.

O fenótipo contráctil do músculo liso vascular, relacionado com o tono e a dilatação vascular, aparenta níveis intracelulares reduzidos de mRNA total e uma capacidade mínima de sintetizar as moléculas da matriz extracelular (com excepção de componentes, como a laminina, da membrana basal). A modificação fenotípica da célula muscular lisa, fruto de modificações hormonais e microambientais várias, vai levar a modificações extremas do seu padrão e actividade, que terminam numa maior capacidade de síntese de fibronectina, colagénio e elastina, elementos estruturantes da matriz, e que acabam por influenciar positivamente os processos de proliferação e migração da célula muscular lisa,

expression of smooth muscle, which acquires a secretory (rather than contractile) phenotype. They also regulate the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade collagen and extracellular matrix (pro-MMP-9 and pro-MMP-2). Increased expression of inflammatory cyclooxygenase (COX)-2, induced by Ang II via the AT₁-R, triggers the synthesis in macrophages of MMP-2 (72-kDa) and MMP-9 (92-kDa)⁽¹⁹⁾, both closely linked to degradation of the fibrous cap and the instability of the atherosclerotic plaque.

The contractile phenotype of vascular smooth muscle, important for vascular tone and dilatation, presents low intracellular levels of total mRNA and little ability to synthesize extracellular matrix molecules (except for basement membrane components such as laminin). Modification of this phenotype arising from hormonal and microenvironmental changes radically alters its pattern and activity, resulting in greater synthesis of fibronectin, collagen and elastin (structural elements of the matrix) and enhancing smooth muscle cell proliferation and migration, as well as the formation of neointima and remodeling and stiffening of the vessel wall^(9, 16, 29).

By synthesizing ROS, including H₂O₂, and modulating p38 MAPK and ERK1/2, Ang II stimulates protein synthesis and induces cell hypertrophy and, possibly, the migration of muscle cells to the intima, by increasing the production of tenascin, an antiadhesive molecule that inhibits the normal binding of the cell to fibronectin. It also enhances the expression of the AT₁-R in vascular smooth muscle; this is further enhanced by hypercholesterolemia⁽³⁰⁾, which in turn increases the synthesis of proteoglycans (which retain lipoproteins, particularly LDL, with apoB in the subendothelial space) and fibronectin (the direct effects of Ang II on the synthesis of collagen, elastin and laminin are less marked) and influencing the ability of smooth muscle cells to capture modified LDL and to contribute to the formation of foam cells.

Besides its direct effects, Ang II also has indirect effects on smooth muscle cells, resulting from its promotion of other growth

assim como a formação da neoíntima e a *remodelagem* e a rigidez da parede vascular^(9, 16, 29).

A angiotensina II é capaz, através da síntese de ROS (e de H₂O₂) e da modulação da p38 MAPK e ERK1/2, de estimular a síntese de proteínas e de induzir a hipertrofia celular, assim como, possivelmente, a migração da célula muscular para a íntima (através da estimulação da tenascina, molécula antiadesiva, inibidora da normal fixação da célula à fibronectina). É também capaz de impelir à maior expressão de AT₁-R no músculo liso vascular, facto, aliás, potenciado pela existência de hipercolesterolemia⁽³⁰⁾, acentuando, ainda mais, a síntese de proteoglicanos (capazes de reterem lipoproteínas com apoB – particularmente LDL – no espaço subendotelial) e de fibronectina (os efeitos directos da angiotensina II na síntese de colagénio, elastina e laminina são menos explícitos) e influenciando a capacidade da célula muscular lisa em captar LDL modificadas (e de contribuir para a formação de células espumosas).

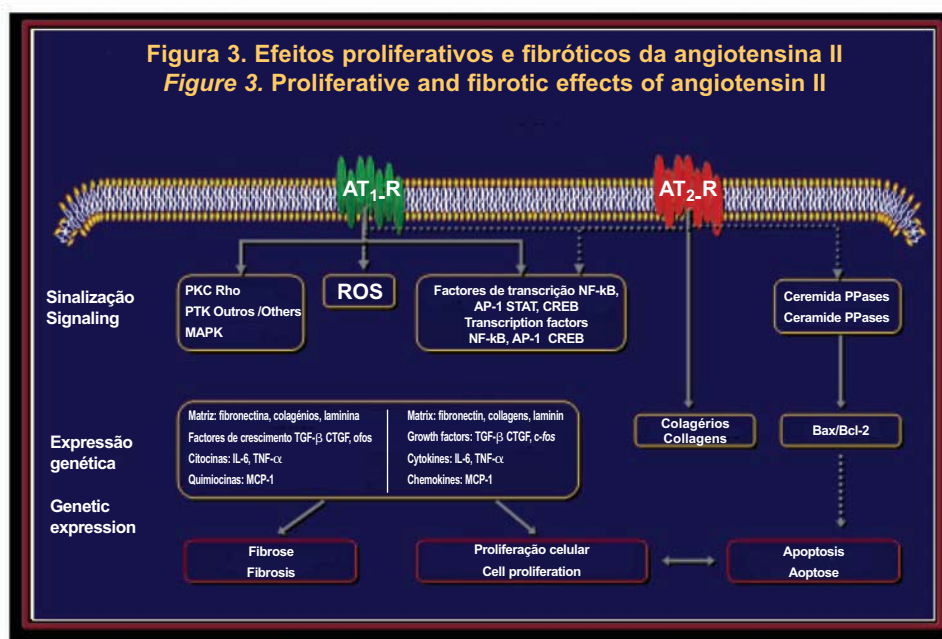
Para além dos efeitos directos da angiotensina II, a célula muscular lisa sofre ainda os efeitos indirectos, resultantes da referida promoção de outros factores de crescimento^(9, 30), maioritariamente pró-proliferativos (PDGF, IGF-1, bFGF, HB-EGF e epiregulina)ⁱⁱ; aparentemente, a indução e os efeitos biológicos

factors^(9, 30), most of which are proliferative (PDGF, IGF-1, bFGF, HB-EGF and epiregulin). It appears that the induction of growth factors and their biological effects are largely dependent on a functional RAS (*Figure 3*).

Another fundamental element in the pathophysiology of endothelial dysfunction and the progression of atherothrombotic vascular disease is apoptosis of endothelial cells, macrophages and smooth muscle cells.

A detailed discussion of the intrinsic mechanisms of vascular apoptosis⁽³¹⁻³⁵⁾ is beyond the scope of this work. Apoptosis is a form of programmed cell death, characterized by cell shrinkage, membrane blebbing and chromatin condensation. A range of stimuli acting on a wide variety of receptors including Fas/FasL and type 1 and 2 TNF receptors and using different signal transduction pathways trigger cascades of caspases that execute the cell's program of self-destruction and cleavage of cell structures, at specific sites and in a controlled fashion.

Endothelial cell apoptosis can compromise the structural integrity of the vessel wall and increase its vulnerability to inflammatory atherosclerotic lesions. Apoptosis activates inflammatory pathways leading to release of cytokines, adhesion molecules and complement and further cell death, promoting necro-



dos factores de crescimento estão largamente dependentes de um SRA funcional (*Figura 3*).

Um outro elemento fundamental na fisiopatologia da disfunção endotelial e da iniciação e progressão da doença aterosclerótica e vascular deriva da apoptose da célula endotelial (mas também do macrófago e do músculo liso vascular).

A discussão dos mecanismos intrínsecos da apoptose vascular está fora do âmbito deste trabalho ⁽³¹⁻³⁵⁾. A apoptose é uma forma de morte celular (*programada*) caracterizada pela contração (*“encolhimento”*) celular, pela presença de uma membrana celular bolhante e pela condensação da cromatina. Estímulos diversos, actuando numa larga variedade de receptores (Fas/FasL, receptores do TNF tipos I e II) e com vias de transdução do sinal distintas, levam à activação de cascatas de proteases (*caspases*) que executam o programa celular de autodestruição e de clivagem das estruturas celulares, em locais específicos e de forma largamente controlada, sem desencadear resposta inflamatória.

A apoptose da célula endotelial pode perturbar a integridade estrutural e contribuir para uma maior susceptibilidade da parede vascular e para o desencadear da lesão inflamatória aterosclerótica (a apoptose condiciona a activação de vias inflamatórias, com a libertação de citocinas, moléculas de adesão e complemento e a amplificação da morte celular), favorecendo a progressão do núcleo lipídico necrótico (com apoptose dos macrófagos/células espumosas); a instabilidade e a trombogenicidade da placa podem, também, ser agravadas pela apoptose do músculo liso vascular (*Figura 4*). Por outro lado, a apoptose acarreta uma modificação das características anticoagulantes do endotélio normal: as células apoptóticas são pró-coagulantes e pró-agregantes plaquetares ⁽³³⁾.

Numerosos trabalhos confirmam o papel dos AT₁-R (e dos AT₂-R) no desencadear da apoptose endotelial (*Figura 3*). Curiosamente, a angiotensina II, no músculo liso vascular, contraria a apoptose induzida pelo NO• e promove a sobrevivência celular ⁽⁹⁾.

Os efeitos pró-apoptóticos da angiotensina

sis of the lipid core with apoptosis of macrophages and foam cells; the instability and thrombogenicity of the plaque can also be aggravated by apoptosis of vascular smooth muscle (*Figure 4*). At the same time, apoptosis modifies the anticoagulant properties of normal endothelium: apoptotic cells are procoagulant and proaggregant ⁽³³⁾.

Various studies have confirmed the role of the AT₁-R and AT₂-R in triggering endothelial apoptosis (*Figure 3*). Surprisingly, in vascular smooth muscle, Ang II counteracts apoptosis induced by NO• and promotes cell survival ⁽⁹⁾.

The proapoptotic effects of Ang II in endothelial cells appear to depend at least partly on the formation of ROS and MAPK3-dependent dephosphorylation of ERK1/2, leading to underexpression of Bcl-2 (an anti-apoptotic factor) and overexpression of Bax (a proapoptotic factor) ⁽³⁶⁾. These changes contribute to induction of the mitochondrial apoptosis pathway in endothelial cells; some studies suggest that the Fas protein is also involved.

Ang II can indirectly induce endothelial cell apoptosis through the oxidation of LDL, producing oxLDL. Hypercholesterolemia and raised LDL cholesterol increase the expression of the AT₁-R in cells, and Ang II upregulates lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) receptors; these surface receptors endocytose atherogenic oxLDL ^(35, 37). Oxidized lipids from oxLDL induce modifications in the structure of cellular proteins, increase oxidative stress and cellular lipoperoxidation, and alter the regulation of various processes of signal transduction and genetic transcription ^(33, 38, 39). Through these changes, and with the direct involvement of the LOX-1 receptor, oxLDL induces endothelial apoptosis, alters the fibrinolytic balance and contributes to atherothrombosis.

5. Proinflammatory effects of angiotensin II ^(19, 26, 40-44)

Oxidized LDL promotes the formation of foam cells derived from monocytes, macrophages and smooth muscle cells and stimu-

II, nas células endoteliais, parecem depender, pelo menos em parte, da formação de ROS e da desfosforilação MAPK3-dependente da ERK1/2¹, o que motiva a consequente subexpressão do *Bcl-2* (factor anti-apoptótico) e a sobreexpressão do *Bax* (factor pró-apoptótico)⁽³⁶⁾. Estes factores vão facilitar a indução da via mitocondrial da apoptose na célula endotelial (alguns trabalhos, sugerem, igualmente, o possível envolvimento da proteína Fas).

A angiotensina II pode, indirectamente, induzir a apoptose da célula endotelial através da modificação oxidativa das LDL (LDL oxidadas, oxLDL). A hipercolesterolemia e o aumento do colesterol das LDL aumentam a expressão celular dos AT₁-R e a angiotensina II induz a expressão de receptores LOX-1 (receptor de superfície capaz de fazer a endocitose de oxLDL aterogénicas)^(35, 37). Os lípidos oxidados, oriundos das oxLDL, induzem a modificação da estrutura das proteínas celulares, determinam fenómenos de *stress* oxidante e de lipoperoxidação celular e alteram a regulação de vários processos de transdução de sinal e transcrição genética^(33, 38, 39). Através deles, e com a participação directa do receptor LOX-1, as oxLDL são capazes de induzir apoptose endotelial, modificar o balanço fibrinolítico e contribuir para a aterotrombose.

5. Efeitos pró-inflamatórios da angiotensina II^(19, 26, 40-44)

As oxLDL promovem a formação de células espumosas (*foam-cells*), derivadas dos monócitos/macrófagos e das células musculares lisas, e estimulam a secreção de diversos factores de crescimento e de citocinas (nomeadamente angiotensina II, IL-1 e TNF- α). Para além dos efeitos potencialmente pró-inflamatórios, as oxLDL partilham outras importantes características pró-aterogénicas (imunogenicidade, quimiotaxia sobre células inflamatórias, citotoxicidade endotelial, modulação genética e características pró-trombóticas) bases da teoria oxidativa da aterosclerose.

A angiotensina II estimula e facilita a síntese de colesterol no macrófago, aumenta o

lates the secretion of various growth factors and cytokines, particularly Ang II, IL-1 and TNF- α . Besides its potentially proinflammatory effects, oxLDL has other important atherogenic characteristics – immunogenicity, chemotaxis of inflammatory cells, endothelial cytotoxicity, genetic alterations and prothrombotic properties – linked to the oxidative theory of atherogenesis.

Ang II stimulates cholesterol synthesis in macrophages, increases the inflow of cholesterol into cells, increases the activity of HMG-CoA reductase in macrophages and contributes towards the formation of Ang II/LDL complexes that are not recognized by normal LDL receptors^(29, 43-45).

In recent years, there has been a growing body of evidence to support the inflammatory character – largely indolent, always chronic – of atherothrombotic disease. Given the well-established relationship between the RAS and immune and inflammatory processes, it is clearly important to analyze the role of Ang II as a proinflammatory molecule.

Ang II is closely involved in the many stages of the inflammatory response^(9, 19, 26, 28, 30, 40-46). Mononuclear cells, neutrophils and T and B lymphocytes respond to stimulation by Ang II with chemotaxis and cell proliferation; the peptide regulates the recruitment of inflammatory cells (monocytes and neutrophils) in vascular lesions, through the expression of factors that modify vascular permeability via prostaglandins and VEGF; it induces the expression of adhesion molecules (P-selectin, intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1] and VCAM-1) and chemokines (MCP-1 and IL-8) in endothelial cells and vascular smooth muscle. Inflammatory cells structurally express all the elements of the RAS and themselves synthesize Ang II at sites of inflammation and thus extend and perpetuate the vascular lesion.

The fact that ACE, Ang II, the AT₁-R, and activated macrophages expressing CD38 are found together in atherosclerotic plaques indicates that the RAS may have a role in lesion development and progression, as well as in triggering acute events. Ang II causes overex-

influxo intracelular de colesterol, incrementa a actividade intramacrofágica da redutase do HMG-CoA e contribui para a formação de agregados de angiotensina II/LDL, não reconhecidos pelos receptores LDL normais^(29, 43-45).

Nos últimos anos, um número crescente de dados suportam o carácter inflamatório, mais ou menos indolente, seguramente crónico, da doença aterosclerótica. As relações, repetidamente estabelecidas, entre o SRA e o processo imunológico e inflamatório obriga, pois, a analisar o papel da angiotensina II, enquanto molécula pró-inflamatória.

A angiotensina II está intimamente relacionada com os múltiplos estádios da resposta inflamatória^(9, 19, 26, 28, 30, 40-46): as células mononucleares, neutrófilos e linfócitos T e B respondem, com quimiotaxia e proliferação celular, à estimulação pela angiotensina II; o péptido afere o recrutamento das células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) na lesão vascular, mediante a expressão de factores modificadores da permeabilidade vascular (através de prostaglandinas e do VEGF); a angiotensina II induz a expressão de moléculas de adesão (P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1)³ e de quimiocinas (MCP-1 e IL-8)ⁱⁱⁱ, nas células endoteliais e no músculo liso vascular; as células inflamatórias expressam, estruturalmente, todos os elementos do SRA e sintetizam *de per se* angiotensina II, nos locais de inflamação e, dessa forma, amplificam e perpetuam a lesão vascular.

Nas placas ateroscleróticas, a colocalização da ECA, da angiotensina II, do AT₁-R e de macrófagos activados (CD38) indicia um possível papel do SRA no desenvolvimento e progressão da lesão, assim como no desencadear dos eventos agudos. A angiotensina II determina a sobreexpressão de TNF- α e de IL-6 (nos macrófagos e nas células musculares lisas), por processos que envolvem a produção de ROS e a activação de factores de transcrição nuclear.

Apesar do papel central desempenhado pelo NF- κ B na indução da resposta inflamatória, a angiotensina II é capaz de activar muitos outros factores de transcrição nuclear: o AP-1, os factores de transcrição da família

pression of TNF- α and IL-6 in macrophages and smooth muscle cells by processes that involve the production of ROS and activation of nuclear transcription factors.

Although NF- κ B has a central role in induction of the inflammatory response, Ang II activates many other nuclear transcription factors, including AP-1, transcription factors of the STAT family and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-response element-binding protein⁽³⁷⁾.

Activation of NF- κ B appears to depend on activation of Rho proteins of GTPases⁽²⁶⁾, which explains how statins alter AT₁-R expression by inhibiting mevalonate synthesis and disrupting geranylgeranyl-pyrophosphate-dependent processes and Rho activation. In smooth muscle cells, Ang II (acting via the AT₁-R through redox signals and activation of tyrosine kinases and MAPK, and also via the AT₂-R through the production of ceramide) induces activation and nuclear translocation of NF- κ B, degradation of I κ B (a transcription factor inhibitor) and NF- κ B-dependent genetic transcription (Figure 4). However, while the AT₁-R/NF- κ B pathway leads to upregulation of angiotensinogen (in hepatocytes), MCP-1, IL-6 and VCAM-1, the AT₂-R/NF- κ B pathway upregulates RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) (and possibly NO \bullet and COX-2), which is mainly seen in glomerular renal disease.

Interestingly, the inflammatory signal transduction pathways used by Ang II are very similar to those used by other proinflammatory cytokines such as IL-1 β , and TNF- α , which confirms that Ang II is a genuine cytokine and suggests that there is crosstalk between different cytokines in the induction and amplification of the immune and inflammatory response.

6. Angiotensin II, coagulation and fibrinolysis

Plaque rupture and thrombus formation are the structural and functional elements under-

STAT e a proteína de ligação aos elementos de resposta do cAMP (adenosina monofosfato cíclico)⁽³⁷⁾.

A activação do NF- κ B depende, aparentemente, da activação de proteínas *Rho* das *GTPases*⁽²⁶⁾ (donde se compreende que as estatinas possam interferir na expressão dos AT₁-R, através da inibição da síntese do mevalonato e da interferência nos processos dependentes da geranilgeranil-pirofosfato e da activação da *Rho*). Nas células musculares lisas, a angiotensina II, através dos AT₁-R (influído por sinais de oxidação-redução e pela activação da tirosina cínases e da MAPK), mas também dos AT₂-R (através da produção da ceramida), induz a activação e a translocação nuclear do NF- κ B, a degradação do I κ B (elemento inibidor do factor de transcrição) e a transcrição genética dependente do NF- κ B (*Figura 4*). Mas, enquanto que a via do AT₁-R/ NF- κ B leva a amplificação dos genes do angiotensinogénio (no hepatócito), da MCP-1, da IL-6 e da VCAM-1, a via do AT₂-R/ NF- κ B determina a expressão da RANTES⁴ (e possivelmente do NO• e da COX-2), com representação fundamental na doença glomerular e renal.

Curiosamente, as vias de transdução de sinal inflamatório afeitas pela angiotensina II são, em tudo, similares às usadas por outras citocinas pró-inflamatórias (IL- β , e TNF- α), confirmando a angiotensina II como uma *verdadeira* citocina e sugerindo a possibilidade de um efeito cruzado (“*cross talk*”) entre diferentes citocinas na indução e amplificação da resposta imunológica e inflamatória.

6. Angiotensina II, coagulação e fibrinólise

A rotura da placa e a formação de trombo é o elemento estruturante e funcional subjacente à maioria das manifestações agudas da aterosclerose. A trombogenicidade da placa aterosclerótica⁽⁴⁸⁾ é modulada por factores diversos (hemodinâmicas, sistémicos e locais) (*Quadro II*) e é largamente favorecida por perturbações da homeostasia vascular e do balanço fibrinolítico.

lyng most acute manifestations of atherothrombosis. The thrombogenicity of the atherosclerotic plaque⁽⁴⁸⁾ is modulated by hemodynamic, systemic and local factors (*Table II*) and is considerably enhanced by disturbances in vascular homeostasis and fibrinolytic balance.

The transmembrane glycoprotein tissue factor (TF), the primary initiator of coagulation, promotes the formation of the active TF/VIIa complex after vascular injury and activates the coagulation cascade, which leads to fibrin deposition and platelet activation^(39, 40). Besides its known role in hemostasis and thrombosis, TF is implicated in many other pathophysiological processes via protease-activated receptors (PARs) in vascular cells, including signal transduction, angiogenesis, cell proliferation and migration, inflammation and metastasization.

Through the AT₁-R, Ang II increases expression of TF in endothelial cells, monocytes/macrophages and vascular smooth muscle cells⁽⁹⁾. The higher plasma TF values found in patients with myocardial infarction, which are lowered by RAS blockade, suggest that induction of TF by Ang II may be directly or indirectly involved in acute atherothrombotic events.

Furthermore, Ang II alters the macrophage profile and the balance between T-helper type 1 (Th1) cells, which produce interferon (IFN)- γ , and Th2 cells, which produce the anti-inflammatory IL-4, promoting the accumulation (relative or absolute) of IFN- γ in the plaque and thereby increasing cell activity and the morphological instability of the lesion; specific AT₁-R blockade prevents the secretion of these cytokines by Th1 lymphocytes⁽⁴³⁾.

At the same time, the fibrinolytic system also has important effects on the thrombogenicity of the plaque^(51, 52). Plasminogen activation, part of the fibrinolytic system, consists of a series of enzyme reactions that degrade the fibrin clot. The principal enzyme in this process is plasmin, which degrades fibrin by cleaving the alpha and gamma chains of polymerized fibrinogen, and affects the extracellu-

Quadro II. Factores moduladores do substrato trombogénico da placa aterosclerótica (adaptado de Fuster, 2002)

Factores hemodinâmicos locais	<ul style="list-style-type: none"> • Tensão de cisalhamento • Stress de estiramento
Natureza do substrato exposto	<ul style="list-style-type: none"> • Grau de lesão arterial (e da placa) • Composição da placa aterosclerótica <ul style="list-style-type: none"> – Núcleo lípidico – Camada fibrosa – Células inflamatórias e MMP – Localização da placa • Trombo mural residual
Factores trombogénicos sistémicos	<ul style="list-style-type: none"> • Dislipidemias aterogénicas (hiperapoB) • Estados hiperadrenérgicos • Tabagismo • Diabetes mellitus • Homocisteína • Lipoproteína (a) • Inflamação (e infecção) • Estados pró-trombóticos • Alteração do balanço fibrinolítico

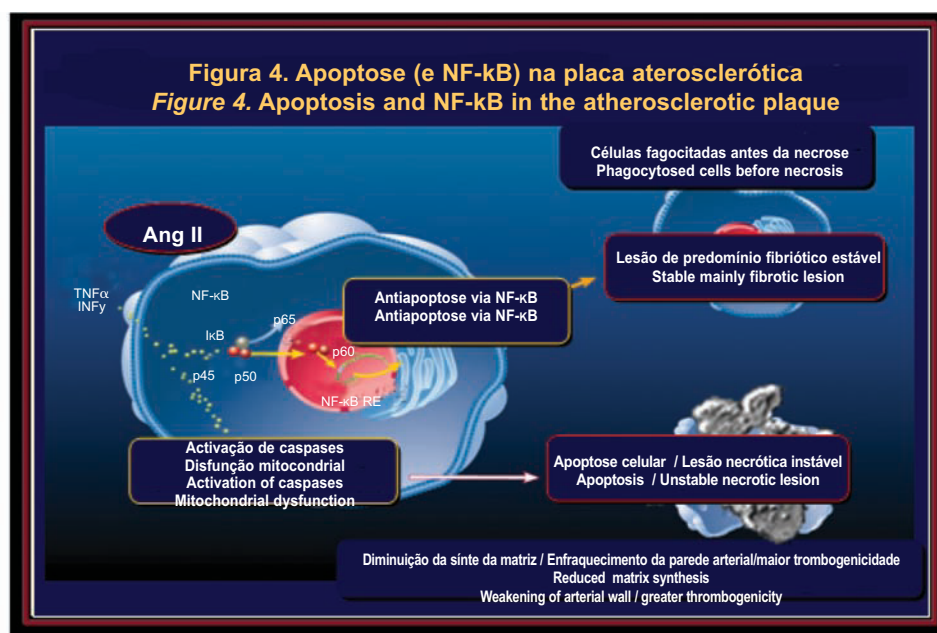
Table II. Factors affecting the thrombogenic substrate of the atherosclerotic plaque (adapted from ⁽⁴⁹⁾)

Local hemodynamic factors	Shear stress Strain Extent of arterial lesion (and of plaque) Composition of atherosclerotic plaque Lipid core
Nature of the substrate exposed	Fibrous cap Inflammatory cells and MMPs Location of plaque Residual mural thrombus Atherogenic dyslipidemia (hyperapo B) Hyperadrenergic states Smoking Diabetes
Systemic thrombogenic factors	Homocysteine Lipoprotein(a) Inflammation (and infection) Prothrombotic states Altered fibrinolytic balance

O *factor tecidual* (TF) é uma glicoproteína transmembrana, iniciador primário da coagulação sanguínea, que, após a lesão vascular, promove a formação de complexos activos TF:VIIa e activa a cascata de coagulação, que leva à deposição de fibrina e à activação das plaquetas ^(39, 40). Para além do seu reconhecido papel na hemostase e trombose, o TF está também implicado em muitos outros processos fisiopatológicos, através de receptores

lar matrix and cell migration. It is derived from plasminogen by the action of two serine proteases, tissue plasminogen activator (t-PA), the most important, and urokinase plasminogen activator (u-PA).

The plasminogen activators are, ideally, in functional equilibrium with plasminogen activator inhibitors. Besides various plasma proteases that inhibit fibrinolysis and neutralize plasmin, including α_2 -antiplasmin and α_2 -



activados por proteases (PAR), nas células vasculares, tais como a transdução de sinal, a angiogénese, a proliferação e a migração celular, a inflamação e a metastização.

A angiotensina II, através dos AT₁-R, é capaz de aumentar a expressão de TF nas células endoteliais, nos monócitos/macrófagos e nas células musculares lisas vasculares⁽⁹⁾. A confirmação de valores plasmáticos mais elevados de TF nos doentes com enfarte agudo miocárdio, passíveis de serem reduzidos pelo bloqueio do SRA, sugere que a indução desta glicoproteína pela angiotensina II possa estar, directa ou indirectamente, implicada no desencadear de eventos aterotrombóticos agudos.

Além disso, a angiotensina II é capaz de perturbar o perfil macrofágico e o balanço entre células Th 1 (produtoras de INF- γ) e células Th2 (produtoras de IL-4, anti-inflamatórias), favorecendo o acumulo, absoluto ou relativo, na placa, de interferão (INF- γ) e contribuindo, dessa forma, para a maior actividade celular e instabilidade da lesão morfológica (o bloqueio específico dos AT₁-R é capaz de prevenir a secreção desta citocina pelos linfócitos Th 1)⁽⁴³⁾.

Por outro lado, o sistema fibrinolítico contribui também, de forma marcante, para a trombogenicidade da placa aterosclerótica^(51, 52). O sistema activador do plasminogénio (sis-

macroglubulin, there are also specific plasminogen inhibitors, of which plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is an example.

PAI-1, also known as serpinE1, belongs to the family of serine protease inhibitors (SERPIN). It is the principal inhibitor of t-PA and u-PA, and hence influences intravascular fibrinolysis, but also has other ligands, including glycosaminoglycans, matrix proteins and scavenger receptors, which are the basis of some of PAI-1's biological effects: inhibition of activated protein C, modification of interactions between vascular smooth muscle and the matrix, and modulation of cell migration and proliferation^(42, 44).

In physiological conditions, PAI-1 is released into the extracellular space and the circulation by hepatocytes, adipocytes and platelets. However, in pathological conditions, many other cells secrete PAI-1, including activated endothelial cells and inflammatory cells. Biosynthesis of PAI-1 is regulated by various growth factors, cytokines and inflammatory mediators, hormones, and other compounds.

Ang II induces a significant rise in PAI-1 mRNA, leading to a rapid and dose-dependent increase in secretion by endothelial and vascular smooth muscle cells^(19, 26, 43). Although the AT₁-R may be involved, some studies sug-

tema fibrinolítico) é um conjunto de reacções enzimáticas que permitem a degradação do coágulo de fibrina. A principal enzima deste processo é a plasmina (capaz de degradar a fibrina, pela clivagem das cadeias alfa e gama do fibrinogénio polimerizado, e de influenciar a matriz extracelular e a migração celular) deriva do plasminogénio, graças à acção de duas serina proteases: uma, predominante, o activador do plasminogénio de tipo tecidual (t-PA) e outra, a urocínase (u-PA).

As funções dos activadores do plasminogénio estão, desejavelmente, em equilíbrio funcional com as dos inibidores dos activadores do plasminogénio. Além de várias proteases plasmáticas inibidoras da fibrinólise (e neutralizantes da plasmina): a α_2 -antiplasmina e a α_2 -macroglobulina, há também inibidores específicos do plasminogénio, de que o PAI-1 (inibidor do activador do plasminogénio) é exemplo.

O PAI-1 (actualmente *serpina E1*), pertencente à família dos inibidores das serinas proteases (SERPIN)⁵, é o principal inibidor do t-PA (e também do u-PA), interferindo, portanto, na fibrinólise intravascular. Tem, no entanto, outros ligandos: glucosaminoglicanos, proteínas da matriz e receptores *scavenger*, que fundamentam alguns dos efeitos biológicos do PAI-1: a inibição da proteína C activada, a modificação das interacções do músculo liso vascular com a matriz e a modulação da migração e proliferação celular^(42, 44).

Em condições fisiológicas, o PAI-1 é libertado no espaço extracelular e na circulação pelos hepatócitos, adipócitos e plaquetas; no entanto, em condições fisiopatológicas, muitas outras células (nomeadamente as células endoteliais activadas e as células inflamatórias) são também capazes de segregar PAI-1. A sua biossíntese é regulada por diversos factores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios, hormonas e outros compostos.

A angiotensina II induz um aumento significativo do mRNA do PAI-1 e causa um incremento rápido, dependente da dose, da sua secreção, pelas células endoteliais e músculo

gest that this process may be mediated by angiotensin IV, a breakdown product of Ang II, via a recently discovered specific receptor, the AT₄-R. This is a transmembrane enzyme of the insulin-regulated membrane aminopeptidase (IRAP) family^(8, 55). Thus, Ang II, as well as promoting coagulation, may also influence fibrinolytic balance and the prothrombotic state of vascular patients.

7. Angiotensins, aldosterone and vascular disease

Although Ang II is considered the most important active peptide of the RAS and is responsible for most of its known physiological and pathophysiological effects, a brief reminder is in order that recent studies suggest that other angiotensins are also involved in cardiovascular disease^(41, 56).

Among these, angiotensin III has a crucial role, since it shares many of the physiological cardiovascular effects of Ang II, particularly in terms of vasoconstriction, and appears to play an important part in the pathogenesis of renal disease. Like Ang II, it has proinflammatory properties and chemotactic effects on polymorphonuclear neutrophils and monocytes, and induces the expression of MCP-1 in mesangial cells. It also activates nuclear transcription factors (AP-1 and NF- κ B) via the AT₂-R, and modulates the expression of genes involved in the inflammatory response and in renal damage⁽⁵⁶⁾.

Experimental studies have demonstrated that aldosterone has direct deleterious effects on blood vessels, the heart and the kidneys^(57, 58). It affects vascular tone and reduces the bioavailability of NO• by increasing the activity of membrane NAD(P)H oxidase; it can also interact with other endothelial vasodilator factors such as prostacyclin, and possible hyperpolarizing factors.

Besides its functional effects, aldosterone causes structural and mechanical changes in vessels, in what is known as aldosterone-induced vasculopathy, as a result of increased peripheral vascular resistance and vascular stiffness, raising systolic pressure and after-

liso vascular^(19, 26, 43). Apesar do possível envolvimento do AT₁-R, alguns trabalhos sugerem que este processo possa ser mediado pela angiotensina IV (um produto da degradação da angiotensina II), através de um receptor específico, recentemente identificado: o AT₄-R, uma enzima transmembrana, da família das aminopeptidases, regulada pela insulina (IRAP)^{v (8, 55)}. Dessa forma, a angiotensina II, para além de promover a coagulação, pode ainda influir no balanço fibrinolítico e no estado pró-trombótico do doente vascular.

7. Angiotensinas, aldosterona e doença vascular

Uma palavra, necessariamente muito curta, para recordar que, apesar da angiotensina II ser considerada como o principal péptido activo do SRA, responsável pela maioria dos efeitos, fisiológicos e fisiopatológicos, conhecidos, estudos recentes sugerem o envolvimento de outras angiotensinas na doença cardiovascular^(41, 56).

Entre eles, a *angiotensina III* tem um papel fundamental, uma vez que partilha muitos dos efeitos fisiológicos cardiovasculares da angiotensina II (nomeadamente o efeito vasoconstritor) e parece ter um papel relevante na patogénese da doença renal. A angiotensina III, tal como a angiotensina II, tem propriedades pró-inflamatórias e efeitos quimiotácticos sobre polimorfonucleares neutrófilos e monócitos (sendo capaz de induzir, nas células mesangiais, a expressão de MCP-1). É também capaz de activar factores de transcrição nuclear (AP-1 e NF-κB), via AT₂-R, e de modular a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e na lesão renal⁽⁵⁶⁾.

Estudos experimentais demonstraram que a *aldosterona* tem efeitos directos, potencialmente deletérios, nos vasos, no coração e no rim^(57, 58). A aldosterona é capaz de interferir no tono vascular e de diminuir a biodisponibilidade do NO•, como consequência do aumento da actividade da NAD(P)H oxídase de membrana; pode, também, interferir com outros factores vasodilatadores endoteliais,

load. These effects may derive directly from induction of vascular smooth muscle growth and proliferation and, indirectly, from interaction with ET-1 – aldosterone modulates tissue ET-1 concentrations, and ET-1 stimulates aldosterone secretion – or with PAI-1 as a promoter of vascular fibrosis.

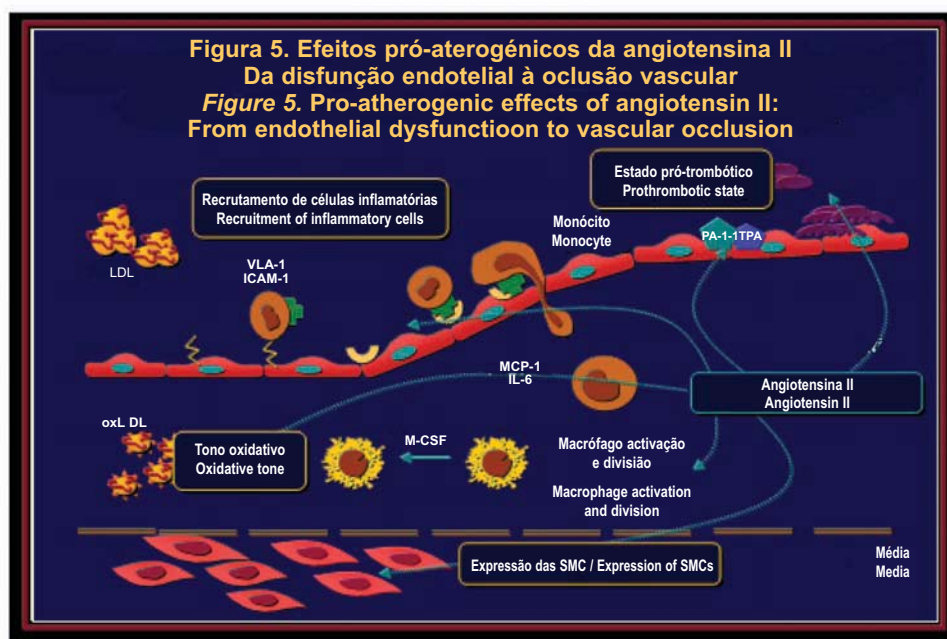
Interaction of aldosterone with ET-1 is a key element in myocardial fibrosis, as part of a larger process that also involves the mineralocorticoid receptor, Ang II, the AT₁-R, ACE and TGF- β ₁, although, unlike Ang II, aldosterone has not been shown to have direct effects on cardiac fibroblasts. Aldosterone also inhibits noradrenaline reuptake in cardiac adrenergic nerve endings and affects the sympathetic-vagal balance and baroreflex activity in animal and human studies.

8. Summary

As shown above, there is today a large body of evidence that supports the important role of the RAS in the cardiovascular disease continuum: from endothelial dysfunction to vascular occlusion (*Figure 5*).

In the earlier stages of vascular disease, activation of the RAS promotes functional changes, of which endothelial damage and dysfunction – with apoptosis, changes in permeability and surface expression of cytokines and adhesion molecules – is the best example. The deposition of atherogenic lipoproteins in the intima, their oxidative modification and the onset and amplification of the inflammatory response strengthens the atherogenic role of the RAS.

Inflammatory cells, particularly macrophages, are now known to be the main source of ACE and Ang II in the vascular wall, in a process that culminates in structural changes in the artery and progression of the atherothrombotic plaque. Ang II promotes the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and their phenotypic differentiation in a pattern of synthesis that accelerates vascular disease. By modulating the inflammatory response and, in general, all the elements of the plaque, Ang II plays a part in its instabil-



tais como a prostaciclina ou com possíveis factores hiperpolarizantes.

Além das alterações funcionais, a aldosterona determina também modificações vasculares estruturais e mecânicas (*vasculopatia da aldosterona*), como resultado do incremento das resistências vasculares periféricas e da rigidez vascular (com amplificação da pressão sistólica e da pós-carga). Estes efeitos parecem derivar, directamente, da indução do crescimento e proliferação do músculo liso vascular e, indirectamente, da cooperação com a ET-1 (a aldosterona é capaz de modular as concentrações teciduais e os efeitos da ET-1 e esta pode estimular a secreção de aldosterona) ou com o PAI-1 (enquanto promotor da fibrose vascular).

A coadjuvação da aldosterona com a ET-1 é um elemento chave da fibrose miocárdica, num processo mais largo que envolve também o receptor mineralocorticoide, a angiotensina II, o AT₁-R, a ECA e o TGF- β 1 (não é possível afirmar efeitos directos da aldosterona – ao contrário da angiotensina II – nos fibroblastos cardíacos). A aldosterona inibe, também, a recaptação de noradrenalina nas terminações nervosas adrenérgicas cardíacas e interfere, em estudos animais e humanos, no balanço simpático-vagal e na actividade do barorreflexo.

ity, in the onset of acute events and in the promotion of the local prothrombotic status that leads to infarction. It is thus essential to understand the RAS and to analyze its effects, in order to modify its consequences.

“The real purpose of scientific method is to make sure Nature hasn’t misled you into thinking you know something you don’t actually know... If you get careless or go romanticizing scientific information,... Nature will soon make a complete fool out of you.”

Robert Persig: *Zen and the Art of Motorcycle Maintenance* (1974)

8. Sumário

Tal como realçámos, há hoje um largo conjunto de dados que fundamentam o papel central do SRA no contínuo da doença cardiovascular: da disfunção endotelial à oclusão vascular (*Figura 5*).

Nos estádios mais precoces da doença vascular, a activação do SRA promove o aparecimento e o desenvolvimento de alterações funcionais, de que a lesão e disfunção endotelial – com a apoptose, as alterações da permeabilidade e a expressão à superfície de citocinas e moléculas de adesão – é o melhor paradigma. A deposição de lipoproteínas aterogénicas na íntima, a sua modificação oxidativa e o desencadear e a amplificação da resposta inflamatória reforça o papel do ambiente aterogénico que o SRA favorece.

As células inflamatórias (e, em particular os macrófagos) são agora a principal origem da ECA e da angiotensina II na parede vascular, num processo que culmina na modificação estrutural da artéria e na progressão da placa aterotrombótica. A angiotensina II promove a migração do músculo liso vascular e a sua proliferação e diferenciação fenotípica num padrão de síntese que acelera a doença vascular. Ao modular a resposta inflamatória

e, de uma forma global, todos os elementos da placa, a angiotensina II tem uma palavra na instabilidade da mesma, na emergência dos eventos agudos e no favorecimento do estado pró-trombótico local que determina o enfarte. É, por isso, fundamental conhecer o SRA, compreender e analisar os seus efeitos, para poder modular as suas consequências.

“The real purpose of the scientific method is to make sure Nature hasn’t misled you thinking you know something you don’t actually know... If you get careless or go romanticising information Nature will soon make a fool out of you”

Robert Persig: ***Zen and the Art of Motorcycle Maintenance (1974)***

Pedido de separatas para:
Address for Reprints:

Pedro Marques da Silva
Serviço de Medicina Interna
Hospital de Santa Marta
1169-024 Lisboa
e-mail: pmarques.silva@sapo.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Jeunemaitre X. Genetics of the human renin angiotensin system. *J Mol Med* 2008; 86: 637-41
2. Corvol P, Jeunemaitre X, Charru A, Soubrier F. The renin-angiotensin system in human hypertension. In: Haber E (ed.). *Molecular Cardiovascular Medicine*. New York: Scientific American, 1995 : 259-74
3. O'Malley JP, Maslen CL, Illingworth DR. Angiotensin-converting enzyme and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 407-15
4. Jacoby DS, Rader DJ. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease. From genes to treatment. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1155-64
5. Farmer JA, Torre-Amione G. The renin angiotensin system as a risk factor for coronary artery disease. *Curr Atheroscl Rep* 2001; 3: 117-24
6. Henrion D, Benessiano J, Iglarz M, Philip I, Levy BI. Genetic determinants of vascular reactivity. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4: 41-8
7. Mendonça MI, Marques da Silva P, Brehm A, Freitas AI, Freitas S, Sousa AC et al. Polimorfismos do gene da ECA e risco de doença coronária numa população portuguesa. *Rev Port Cardiol* 2004; 23: 1593-601
8. Mendonça MI, Brehm A, Marques da Silva P, Freitas AI, Freitas S, Sousa AC et al. Polimorfismos do gene da ECA está associado com a gravidade e a extensão da doença coronária. *Rev Port Cardiol* 2004; 23: 1695-11
9. Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regulatory Peptides* 2000; 93: 65-77
10. Re RN. Mechanisms of disease: local renin-angiotensin-

- aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nature Clin Practice Cardiovasc Med* 2004; 1: 42-7
11. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 2008; 86: 615-21
12. Nguyen G, Contrepas A. The (pro)renin receptors. *J Mol Med* 2008; 86: 643-6
13. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Cir Res* 1998; 83: 1182-91
14. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-72
15. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 11-33
16. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 639-72
17. Wesselman JPM, De Mey JGR. Angiotensin and cytoskeletal proteins: role in vascular remodeling. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4: 63-70
18. Saito Y, Berk BC. Angiotensin II-mediated signal transduction pathways. *Curr Hypertens Rep* 2002; 4: 167-71
19. Skultetyova D, Filipova S, Riecanaky I, Skultety J. The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Patents on Cardiovasc Discovery* 2007; 2: 23-7
20. Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2: 167-73
21. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Cir Res* 2000; 86: 494-501
22. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Cir Res* 2000; 86: 840-44
23. Van Heerebeek L, Meischl C, Stoker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D. NADPH oxidase(s). New source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol* 2002; 55: 561-8
24. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: 277-97
25. Raij L. Hypertension and cardiovascular risk factors. Role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension* 2001; 37 (part 2): 767-73
26. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacol Sciences* 2008; 29: 367-74
27. Strawn WB, Ferrario CM. Mechanisms linking angiotensin II and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 505-12
28. Brasier AR, Recinos III A, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1257-66
29. Delafontaine P. Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses. *Eur Heart J* 1998; 19 (suppl G): G18-22
30. Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 569-77
31. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6
32. tefanec T. Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; 117: 841-54
33. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Cir Res* 2001; 88: 998-1003
34. Choy JC, Granville DJ, Hunt DWC, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1673-90
35. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010: 698-709
36. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 73-9
37. Ferrario CM, Smith R, Levy P, Strawn W. The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. *Am J Med Sci* 2002; 323: 17-24
38. Singh BM, Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia. Relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1296-304
39. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1-9
40. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Mon* 2005; 11: RA194-205
41. Ferrario CM, Strawn WB. Targeting the RAAS for the treatment of atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2005; 2: 221-9
42. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98: 121-8
43. Mazzolai L, Hayoz D. The renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 2006; 8: 47-53
44. Montecucco F, Pende A, Mach F. The renin-angiotensin

system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators of Inflammation* 2009; doi:10.1155/2009/752406

45. Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-478

46. Ferrario CM, Richmond RS, Smith R, Levy P, Strawn WB, Kivlighn S. Renin-angiotensin system as a therapeutic target in managing atherosclerosis. *Am J Therap* 2004; 11: 44-53

47. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egidio J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 321-9

48. Fuster V, Corti R. Evolving concepts of atherothrombosis. In: Fuster V (ed). *Assessing and Modifying the Vulnerable Atherosclerotic Plaque*. Armonk, NY: Futura Publishing, Inc.; 2002: 1-27

49. Ott I. Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med* 2003; 3: 185-92

50. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-22

51. Vaughan DE. Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis. *Am J Cardiol* 2001; 87 (suppl): 18C-24C

52. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 2002; 17: 56-61

53. Vaughan DE. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *Am J Hypertens* 2002; 15: 3S-8S

54. Fay WP. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 196-202

55. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2728-37

56. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzanno S, Plaza JJ, Egidio J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases. Expanding the field. *Hypertension* 2001; 38: 1382-7

57. Struthers AD. Effect of aldosterone on the vascular bed: introducing the aldosterone-induced vasculopathy. In: Braunwald E (ed.): *Harrison's Advances in Cardiology*. New York: McGraw Hill, 2003: 12-7

58. Neves MF, Schiffrin EL. Aldosterone: a risk factor for vascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 59-65

APAPE

Reunião Anual de Electrofisiologia

Lousã, 27 de Novembro de 2009

apape@spc.pt